



TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Cirurgia II

O uso de células estaminais mesenquimais no tratamento de fístulas perianais na doença de Crohn

Mónica Ferreira Francisco 15612

MAIO'2020



TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Cirurgia II

O uso de células estaminais mesenquimais no tratamento de fístulas perianais na doença de Crohn

Mónica Ferreira Francisco 15612

Orientado por:

Dr. João José Malaquias Pires Leitão

MAIO'2020

Abstract

The effective management of perianal fistulas in patients with Crohn's disease presents an extremely challenging problem. Crohn's disease is a rather common disease that in more than 20% patients results in perianal fistula, which take long time to heal and frequently recur, causing physical and psychological burden. The therapeutic tools available, medical and surgical treatment have low quality evidence, providing low healing rates and high recurrence of fistulas. Moreover, there is great morbidity associated with the treatments, as immunosuppression and faecal incontinence. There is space for new approaches and therapies. One of the most promising tools are mesenchymal stem cells. These cells have immunomodulating properties playing a significant role in tissue repair. Several clinical trials in Crohn's perianal fistulizing disease have reported efficacy and safety.

The aim of this narrative review is to present an overview of Crohn's perianal fistulizing disease, outcomes of current medical and surgical therapies, some insight into mesenchymal stem cell mechanisms of immunomodulation and outcomes of mesenchymal stem cells therapies.

Key words: Perianal fistula; Crohn's disease; Mesenchymal stem cells.

Resumo

O tratamento efetivo da doença de Crohn perianal fistulizante apresenta-se como um desafio médico e cirúrgico. A doença de Crohn é uma patologia relativamente frequente que em mais de 20% dos doentes complica com fistulas perianais, as quais têm um tempo de resolução longo e recorrências frequentes, com consequências físicas e psicológicas.. O armamento terapêutico disponível, tanto médico como cirúrgico, tem baixa qualidade de evidência e não atinge as necessidades, mantendo baixos níveis de resolução e elevada recorrência. Para além disso, estas terapêuticas são associadas a morbilidade elevada, como imunossupressão e o risco de incontinência fecal. Há uma grande necessidade de novas ferramentas abordagens nesta área. Uma das apostas mais promissoras são as células estaminais mesenquimais. Estas têm propriedades imunomoduladoras, sendo

importantes na reparação tecidual. Já foram realizados vários ensaios com células estaminais mesenquimais no contexto de doença de Crohn perianal fistulizante com bons resultados de eficácia e segurança.

O objetivo desta revisão narrativa é apresentar uma visão sobre a doença de Crohn perianal fistulizante, sobre as terapêuticas médicas e cirúrgicas atuais, os mecanismos imunomoduladores das células estaminais mesenquimais e os resultados dos ensaios destas no contexto da doença de Crohn perianal fistulizante.

Palavras chave: Fistula perianal; Doença de Crohn; Células estaminais mesenquimais.

O Trabalho Final exprime a opinião do autor e não da FML.

Índice

Introdução.....	5
Doença de Crohn perianal fistulizante.....	6
Tratamento atual	8
Tratamento médico.....	8
Tratamento cirúrgico.....	10
Necessidade de novas terapêuticas.....	12
Células estaminais mesenquimais – mecanismos de imunomodulação	13
Células estaminais no tratamento de fístulas perianais da doença de Crohn	16
O que falta avaliar?	19
Take-home messages	20
Bibliografia	22

Introdução

A doença de Crohn é uma doença inflamatória crónica, com elevada prevalência nos países desenvolvidos. É muitas vezes uma doença debilitante, complicando-se em cerca de um quarto dos doentes com envolvimento perianal, nomeadamente por fístulas e abcessos. A doença perianal é de difícil tratamento, tendo elevadas taxas de recorrência e levando muitas vezes à incontinência fecal. Os tratamentos disponíveis atualmente para o tratamento das fístulas perianais, tanto médicos como cirúrgicos, não têm dado resposta às situações refratárias pelo que têm surgido novas ferramentas, nomeadamente com células estaminais.

Assim esta revisão narrativa pretende dar uma visão geral sobre as fístulas perianais e a evidência existente sobre os tratamentos disponíveis atualmente, passando depois aos conhecimentos atuais sobre as células estaminais mesenquimais, os seus mecanismos de imunomodulação e aos estudos realizados à data com a utilização de células estaminais mesenquimais na doença fistulizante perianal associada à doença de Crohn.

Doença de Crohn perianal fistulizante

A doença de Crohn é uma doença inflamatória intestinal, distinta da colite ulcerosa. A sua prevalência difere significativamente consoante a região do globo, sendo, classicamente, uma doença dos países ocidentais, onde chega a atingir prevalências de mais de 300 por cada 100 mil habitantes.[1] Apesar da prevalência das doenças inflamatórias intestinais começar a estabilizar nos países desenvolvidos, tem havido um aumento de incidência no sul da Europa, Ásia, África e América do Sul, na maioria dos países em desenvolvimento. [2][1][3]

A doença de Crohn é caracterizada por inflamação transmural, podendo afetar qualquer parte do trato gastrointestinal. Cerca de 25% tem apenas doença ileal, 25% doença cólica e 50% ileocólica.[4] A doença pode-se apresentar predominantemente por um de três fenótipos: inflamatório, fibroestenótico ou fistulizante, sendo possível alteração do comportamento ao longo do curso da doença[5], [6] Aproximadamente um terço tem envolvimento perianal, com complicações como abscessos e fístulas.[7]

Em cerca de 35% dos doentes há o desenvolvimento de fístulas. Estas podem ter ou um envolvimento ao longo do trato gastrointestinal ou um envolvimento perianal. As fístulas perianais ocorrem em cerca de 20% dos doentes nos primeiros 20 anos após o diagnóstico [5]. Ocorre particularmente em doentes com envolvimento do cólon e retal. [8] A presença de proctite é dos maiores fatores de risco de pior prognóstico, sendo a proctite ativa um preditor independente de diminuição da resolução da fístula e de maior recorrência. [9]

A teoria mais aceite para a formação de fístulas, a teoria criptoglandular, defende a origem do trajeto a partir da obstrução das glândulas anais que existem ao nível da linha dentada do canal anal, localizadas no plano interesfínctérico. A maioria das fístulas simples parece fazer sentido nesta teoria. No entanto, parecem existir outras explicações, nomeadamente no caso da doença de Crohn, em que existe infeção a surgir a partir de ulcerações e da inflamação transmural do reto e canal anal, favorecendo assim a formação de abscessos e o posterior fistulização para fora do canal anal [10][11]

As fístulas perianais podem ser classificadas (classificação AGA) como simples ou complexas com implicação clínica. As fístulas simples são fístulas superficiais (interesfínctéricas ou transesfínctéricas baixas), com uma única abertura exterior. A

definição de fístula complexa é mais abrangente, entendendo-se como uma fístula profunda, com maior envolvimento do complexo esfintérico (transesfintérica alta, extraesfintérica, interesfintérica ou supraesfintérica) e associada a várias aberturas externas, abscesso, fístula retovaginal ou estenose. Esta classificação é clinicamente relevante pelas fístulas complexas serem mais complicadas de tratar e terem uma evolução mais complicada que as fístulas simples, com maior risco de desenvolvimento de incontinência iatrogénica.[8][11][12] Na doença de Crohn 70 a 80% das fístulas perianais são complexas, tendo frequentemente múltiplos trajetos em simultâneo. [5][13]

Perante o diagnóstico de fístula perianal o doente deve ser avaliado clínica e imagiologicamente. Para avaliação do trajeto e complexidade da fístula, tanto a ecoendoscopia, a ressonância magnética como a observação cirúrgica sob anestesia parecem ser adequados, permitindo uma avaliação correta em 87-91% dos casos. Conjugando dois métodos, este valor atinge os 100%. Assim, a melhor abordagem parece ser combinar vários métodos, como observação cirúrgica mais ecoendoscopia ou ressonância.[14] Deve ser avaliada ainda a atividade da doença luminal, clinicamente e por colonoscopia. A doença ativa vai provocar diarreia e consequentemente exacerbar a sintomatologia anal. Para além disso esta informação é importante para a escolha do tratamento. [15]

A doença fistulizante perianal é a causa de complicações físicas e psicológicas. Causa diversos sintomas debilitantes como dor retal, drenagem prolongada de pus pelos orifícios externos e ainda infeções urinárias recorrentes.[5] Para além disso têm uma evolução desfavorável, com recorrência frequente, um tempo de resolução longo e com necessidade de recorrer a vários procedimentos, por vezes ressecção ou proctomia, para o controlo da sépsis perineal. Destes procedimentos pode resultar incontinência fecal. [13][12]

Para além das suas complicações, a doença perianal está associada a pior prognóstico e evolução da doença de base, sendo um fator preditor de maior probabilidade e rapidez de progressão do comportamento para um fenótipo mais agressivo e de mais complicações. [11][12][17]

Tratamento atual

Para o tratamento das fístulas perianais pode ser considerado tratamento médico e tratamento cirúrgico. A complexidade da fístula, a direção do trajeto fistuloso e a presença de proctite influenciam o tipo de tratamento e a probabilidade de cura [10][12]. Apesar de frequentemente se conseguir a resolução da fístula, em cerca de três quartos dos doentes, a morbidade é grande e o processo de cura lento, sendo necessário múltiplos tratamentos, por vezes com incontinência associada.

Tratamento médico

Os estudos que avaliaram a eficácia dos tratamentos médicos neste contexto são de pequena dimensão, ensaios clínicos abertos ou consideraram a eficácia do tratamento na doença perianal como *outcome* secundário ou resultado de análises de subgrupo. Até à data os tratamentos médicos mais bem estudados são os anticorpos anti-TNF α . [18][12]

Frequentemente são usados antibióticos que parecem melhorar os sintomas e contribuir para a resolução da fístula. Os antibióticos mais comumente usados são a ciprofloxacina e o metronidazol. [12] Num ensaio clínico randomizado, a remissão das fístulas com o uso combinado de adalimumab e ciprofloxacina foi significativamente superior ao de adalimumab mais placebo, apesar do efeito não se manter após descontinuação do antibiótico. [19] Uma meta-análise, que incluiu 3 estudos a avaliar 123 doentes com doença perianal associada à doença de Crohn a fazerem ciprofloxacina ou metronidazol demonstrou um efeito estatisticamente significativo na redução da drenagem da fístula. [20]

Quando à terapia imunossupressora, também há poucos estudos com poder estatístico. [12] Numa meta-análise que avaliava a eficácia de mercaptopurina e azatioprina na doença de Crohn luminal, a análise de subgrupos favoreceu significativamente estes imunossupressores na doença fistulosa contra placebo. [21] Num ensaio clínico aberto comparou-se monoterapia com antibiótico contra antibiótico associado a azatioprina, na qual 15% dos doentes em monoterapia atingiu o *endpoint* primário comparando com 48% da combinação, com significância estatística. [22] Num ensaio clínico contra placebo, tacrolimus oral foi significativamente superior em induzir

melhoria da drenagem da fistula, mas não demonstrou maior remissão das fístulas. Para além disso observou-se nefrotoxicidade[23] A ciclosporina intravenosa pareceu ter boa resposta em pequenos estudos observacionais mas com uma taxa de recorrência elevada após a suspensão da terapêutica.[24], [25]

De notar, os corticosteroides, frequentemente usados na doença luminal moderada a grave, não estão recomendados na doença fistulosa tendo em conta ao aumento de complicações reportadas nestes doentes, estando associados à formação de abcessos e ao aumento da necessidade de cirurgia para trajetos fistulosos.[26] [27], [28]

Dentro dos anticorpos anti-TNF α , o infliximab mostrou resultados mais sólidos. No primeiro estudo, um ensaio randomizado, multicêntrico e duplamente cego com 94 doentes, foi avaliada a resposta da fístula (redução de 50% do número de fistulas drenantes) com duas doses diferentes de infliximab (5mg/kg e 10mg/kg) contra placebo, administrado às 0, 2 e 6 semanas e avaliado às 18 semanas. Foi atingido o *outcome* primário em 26% no grupo placebo, em 68% dos doentes com infliximab 5mg/kg e 56% dos doentes com infliximab 10mg/kg, ambos com significância estatística. A cessação completa da drenagem das fístulas foi observada em 13% com placebo, em 55% no grupo infliximab 5mg/kg e 38% dos doentes com infliximab 10mg/kg, também com significância estatística.[29]

Num estudo seguinte [30] avaliou-se a eficácia de administrações repetidas de infliximab na manutenção do encerramento das fistulas. Neste estudo randomizado e duplamente cego participaram 195 doentes que haviam respondido previamente à indução com infliximab, os quais foram submetidos a infliximab ou a placebo de 8 em 8 semanas durante um período de 54 semanas. O tempo até à perda de resposta foi significativamente maior no grupo infliximab (mediana de >40 semanas) do que no placebo (mediana 14 semanas). Às 54 semanas, 46% dos doentes sob infliximab mantinham resposta, contra 23% dos doentes sob placebo. Quanto ao encerramento completo dos trajetos fistulosos, às 54 semanas foi observada em 36% no grupo infliximab e em 19% no grupo placebo.[30] Nestes mesmos doentes, foi ainda observada uma redução significativa de hospitalizações, cirurgias e procedimentos nos doentes tratados com manutenção de infliximab comparando com o grupo controlo.[31]

Apesar desta melhoria, um estudo posterior demonstrou recaída precoce após a descontinuação do infliximab, com apenas 34% dos doentes que a manter remissão a um ano.[32]

O adalimumab, também um anticorpo anti-TNF α , apesar de não ter um estudo randomizado em contexto de doença perianal, análise de subgrupos e estudos retrospectivos parecem favorecer a sua eficácia. Uma subanálise do estudo *Crohn's Trial of the Fully Human Antibody Adalimumab for Remission Maintenance* demonstrou manutenção sustentada do encerramento das fístulas ao longo de 2 anos na maioria dos doentes.[33] Num estudo retrospectivo multicêntrico com 46 doentes, aos 6 meses 54% tiveram remissão completa e aos 12 meses 41% tinha remissão completa, sendo mais baixa nos doentes com fístulas complexas.[34]

Tratamento cirúrgico

A doença luminal ativa, nomeadamente proctite, interfere com a cicatrização e com o encerramento dos trajetos fistulosos.[35] As fístulas simples têm um curso menos complicado, a maioria é tratada com sucesso com drenagem, colocação de *setons* ou fistulotomia.[10], [13] Para as fístulas complexas, apesar destes procedimentos também serem importantes, em mais de metade dos casos são necessários procedimentos mais invasivos, como é o caso da ileostomia de derivação com desfuncionalização do cólon ou da proctectomia. [13]

A associação frequente de doença fistulizante perianal ativa com a presença de abscessos torna a drenagem destes um procedimento essencial para controlar a sépsis perianal. Nesta drenagem é feita uma incisão seguida da colocação de um dreno. A drenagem deve ser complementada com terapêutica médica, nomeadamente antibióticos.[12], [15]

O pilar da terapêutica combinada médica e cirúrgica assenta na colocação de *setons*. Os *setons* mantêm a patência dos trajetos, impedindo o encerramento precoce e consequentemente a formação de abscessos.[12] Posteriormente são retirados de modo a permitir o encerramento total dos trajetos. A observação cirúrgica sob anestesia com colocação de *setons* associada a infliximab aumenta a resposta inicial, o tempo até à recorrência e reduz a taxa de recorrência das fístulas de forma significativa, quando comparado apenas com infliximab.[36] O tempo ótimo para a remoção dos *setons* não

está estabelecido, no entanto a remoção mais tardia, após o fim da indução ou posteriormente parece ser mais benéfica.[6]

A fistulotomia é o procedimento cirúrgico de escolha no caso de fístulas simples superficiais sem proctite ativa. É um método seguro e com bons resultados de cura e recorrência nestes casos.[35] Em fístulas mais altas e na doença ativa têm o risco de não cicatrização e de incontinência fecal.[6]

Outra técnica possível, é o retalho de avanço da mucosa. Esta técnica consiste na mobilização de porção de um retalho da mucosa retal de modo a selar o orifício interno do trajeto fistuloso, deixando o esfíncter intacto. Numa revisão sistemática, a média de sucesso foi de 64%, com uma média de 9.4% de incontinência. (possivelmente por estiramento em contexto da cirurgia, ectrópion da mucosa com alteração da sensibilidade ou retalho mais profundo com afeção do esfíncter interno[37], e ainda no contexto inflamatória e infeccioso da doença de Crohn).[38]

Ainda é possível a técnica de LIFT, laqueação do trajeto intersfíncteriano da fístula, na qual é feito o isolamento do trajeto fistuloso através do segmento interesfíncterino seguido da sua laqueação e secção.[39] Num estudo com 15 doentes, este procedimento registou uma taxa de sucesso de 67% aos 12 meses, sem documentação de incontinência.[40] Uma meta-análise comparou o LIFT com o retalho de avanço da mucosa, sendo estas comparáveis em termos de eficácia e recorrência, mas com superioridade do LIFT em termos de continência. [41]

Duas opções não invasivas, com a vantagem da preservação do esfíncter, são a cola de fibrina e o *plug* fistular. Apesar de inicialmente promissoras, o seu uso não foi favorecido pela evidência.[39] O *plug* é feito à base de materiais absorvíveis e é colocado no interior da fístula, adaptando ao seu interior, permitindo a fixação do orifício interno. Apesar de ter mostrado resultados em pequenos estudos iniciais, um ensaio clínico controlado comparou o *plug* com a remoção de *seton*, não mostrando diferença significativa na remissão clínica entre os dois grupos às 12 semanas.[42] A cola de fibrina, forma um coágulo que encerra o trajeto da fístula, que ao ser absorvida vai promover a reparação do tecido envolvente. Um ensaio clínico aberto controlado comparou cola de fibrina com remoção de *seton*, avaliado às 8 semanas, observando-se diferença significativa. No entanto, analisando, esta diferença não se verificou nas fístulas complexas.[43]

Em casos refractários pode ser necessário recorrer a procedimentos mais invasivos como a ileostomia de desvio e a proctectomia. A ileostomia de desvio é um procedimento relativamente simples que permite a cicatrização das fístulas e resolução da sépsis perianal, sem levar a incontinência após a reconstrução do trânsito.[44] A ileostomia leva à melhoria da sintomatologia em cerca de dois terços dos casos, no entanto a reconstrução do trânsito é bem sucedida em menos de 20% dos casos por recidiva do quadro. Em cerca de 40% que falharam a ileostomia necessitaram de proctectomia.[45]

Necessidade de novas terapêuticas

O tratamento da doença fistulizante perianal permanece um dos maiores desafios da doença de Crohn. A introdução dos biológicos, trouxe esperança no tratamento da doença fistulizante perianal, sendo o infliximab a única terapêutica médica com evidência baseada num ensaio randomizado neste contexto. Ainda assim implica uma terapêutica contínua, por risco de recorrência. Apesar dos avanços na doença luminal continuam a faltar estudos específicos para a doença perianal, sendo muita da informação disponível retirada de análises de subgrupos e de estudos pequenos e abertos.[39]

À data, as terapêuticas médicas e cirúrgicas disponíveis levam a remissões a um ano na ordem dos 40-50% e a recorrências frequente. Isto indica a necessidade de novas ferramentas terapêuticas nesta área.[6]

Uma das áreas mais promissoras é as células estaminais mesenquimais.[39] Em seguida vão ser revistos os seus mecanismos de ação e posteriormente os ensaios clínicos já realizados nesta área.

Células estaminais mesenquimais – mecanismos de imunomodulação

Nas últimas décadas tem surgido grande interesse no uso de células estaminais como tratamento de variadas doenças. Inicialmente suscitaram grande interesse pelo seu potencial de regeneração e diferenciação, no entanto, mais recentemente, tem-se associado o seu efeito terapêutico ao potencial imunomodelador das CEM. Deste modo, têm surgido inúmeros estudos da sua utilização em patologias inflamatórias e autoimunes.[46]

As células estaminais mesenquimais (CEM) são células estaminais não hematopoiéticas com propriedade de multipotência e autorregeneração. Estas células podem ser encontradas não só na medula óssea, onde foram encontradas pela primeira vez, como também no tecido adiposo, músculo, cordão umbilical, fígado e sangue periférico, entre outros tecidos, [47] sendo facilmente isoladas e multiplicadas[46]. As CEM caracterizam-se por terem potencial de diferenciação nas três linhagens mesenquimais (adipócitos, osteoblastos e condrócitos). [48] CEM originárias de diferentes tecidos, apesar das características principais em comum, têm expressões génicas e fenótipos ligeiramente diferentes, não se entendendo ainda as implicações disto no seu uso clínico. [49][50]

Em 2002, descobriu-se a capacidade das CEM de modular o sistema imunitário. [51] Desde então os mecanismos desta modulação têm vindo a ser clarificados. Estas exercem o seu poder imunomodelador interagindo com vários agentes do sistema imunitário, tanto inato como adquirido e produzindo fatores tróficos anti-fibróticos, anti-apoptóticos e pro-angiogénicos.[46] Um aspeto interessante é o facto destas células parecerem imunoprivilegiadas, tendo baixa expressão de MHC I e MHC II, assim como CD80, CD86, CD40, CD40L. [48] Esta característica também parece ser favorecida pela imunossupressão, permitindo a evasão imunológica. [52]

As CEM não são intrinsecamente imunomoduladoras, necessitando de estímulos sinalizadores de inflamação para a sua ativação.[48] Possuem TLRs (*toll-like receptors*) cuja ativação permite a polarização da CEM num de dois tipos: no fenótipo 1 – perfil pro-inflamatório- ou no fenótipo 2 – perfil imunossupressor -, consoante os tipos de TLRs estimulados.[53] Perante a presença de citocinas inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β especialmente IFN γ , estas vão ser ativadas no fenótipo imunossupressor.[54] Para além

disso, o microambiente pode levar à alteração entre fenótipos das CEM. No início da inflamação (perante baixas concentrações de citocinas), as CEM são pró-inflamatórias recrutando neutrófilos e linfócitos. Com o recrutamento, os níveis de citocinas irão aumentar e levar posteriormente à estimulação do fenótipo imunossupressor das CEM.[55], [56]

Os efeitos imunomoduladores são exercidos principalmente pela expressão parácrina de fatores moduladores, mas também por interação célula a célula. Dos fatores solúveis produzidos pelas CEM ativas encontram-se a IDO, PGE2, NO, TGF- β , IL-10 e PD-L1.[55] A IDO (indoleamine-2,3-dioxygenase) metaboliza e depleta o triptofano, diminuindo a resposta das células T, pela disrupção da via mTOR e da glicólise.[57], [58] Para além disso, perante a depleção de triptofano há a estimulação de células Treg por parte das células dendríticas.[59] A PGE2 (prostaglandina E2) induz a diferenciação dos macrófagos no fenótipo M2 e as células T em Th2, inibindo a produção de Th1.[60], [61] Tanto a IL-10 como a TGF- β , citocinas anti-inflamatórias, são expressas constitutivamente pelas CEM, aumentando a expressão aquando a ativação das CEM.[62], [63]

As CEM interagem com o sistema imune inato suprimindo a diferenciação a partir de monócitos, sua função de apresentação de antígenos. [64][65], [66] Para além das células dendríticas, as CEM também modulam os monócitos/macrófagos. Esta interação é essencial no efeito imunossupressor das CEM, potenciando a função com o restante sistema imune, nomeadamente o adaptativo. As CEM induzem a polarização dos macrófagos na via alternativa M2 (características anti-inflamatórias e regeneradoras) e levam a que estes produzam IDO.[67], [68]

Quanto ao sistema adaptativo, as CEM inibem a proliferação e ativação das células T diretamente e indiretamente através da supressão por Treg. [51], [69], [70] As CEM vão promover a diferenciação por das Treg através de contacto célula a células e por efeitos parácrinos.[71] Têm a capacidade de induzir a diferenciação em Treg mesmo a partir de células T diferenciadas.[70] As CEM têm ainda efeitos supressivos nas células B e NK.[55]

Este modelo de mecanismo de ação, ainda que apoiado in vitro e em estudos animais, ainda não foi demonstrado em seres humanos, colocando-se a questão se as mesmas vias e mecanismos poderão ser aplicadas.[56]

Células estaminais no tratamento de fístulas perianais da doença de Crohn

O primeiro estudo clínico com CEM na doença perianal associado à doença de Crohn, em 2003, foi um caso clínico que descrevia o tratamento bem sucedido, no espaço de uma semana, numa fístula retovaginal após injeção autóloga de CEM derivadas de tecido adiposo[72]. Seguiu-se um estudo de fase I com 4 doentes com injeção autóloga de CEM derivadas de tecido adiposo, em que 3 de 4 mostraram resolução do trajecto às 8 semanas, definido como a total reepitelização do orifício externo da fístula. Não houve efeitos adversos no follow up de 12 e 22 meses.[73] Posteriormente, um estudo de fase IIb comparou tratamento com cola de fibrina versus cola de fibrina com CEM derivadas de tecido adiposo em 50 doentes com fístulas complexas criptoglandulares e de doença de Crohn. Houve resolução da fístula às 8 semanas em 17 de 24 (5 de 7 em DC) doentes tratados com as CEM e 4 de 25 (1 de 7 em DC) apenas com a cola. Adicionalmente, os scores de qualidade de vida foram significativamente melhores nos doentes tratados com CEM [74]

Um estudo de fase III comparou 23 doentes com fístulas criptoglandulares que receberam CEM derivadas de tecido adiposo mais cola de fibrina (grupo A) com 21 que apenas receberam cola de fibrina (grupo B). Fístulas não encerradas às 16 semanas eram elegíveis para retratamento. O estudo falhou em mostrar superioridade do tratamento com as CEM autólogas. Após 16 semanas a taxa de cura era 30.4% no grupo A e 42.8% no grupo B. Às 52 semanas era 55.0% e 63.1%, respetivamente. No fim do estudo, após 2 anos a taxa de cura no grupo A era 50.0% e no grupo B reduziu para 26.3%. Apesar disso a segurança do tratamento foi confirmada e não foi documentado impacto em termos de incontinência [75]

Também com CEM autólogas, foi realizado um ensaio de fase I que estudou a utilização de CEM aplicadas a um *plug* de bio-matriz absorvível. Foram tratados 12 doentes com doença de Crohn, tendo 9 em 12 tido resposta clínica completa aos 3 meses e 10 em 12 aos 6 meses. 10 em 12 tiveram resposta imagiológica.[76]

Apenas foi feito um estudo com CEM autólogas derivadas da medula óssea, em doentes de Crohn refratários a terapia anti-TNF e cirurgia. Foi observado encerramento da fístula em 6 de 9 doentes ao fim de 8 semanas, com resultados mantidos após 1 ano.[77]

Outros estudos foram realizados utilizando CEM alogénicas. Em teoria as células autólogas têm uma menor probabilidade de rejeição e melhor tolerabilidade, no entanto implicam a colheita e posterior tratamento e expansão, requerendo tempo e mais do que um único procedimento cirúrgico. As células alogénicas permitem uma preparação pronta a usar, proveniente dum dador à partida saudável. Faltam estudos comparativos em relação à eficácia e segurança. [6]

Num ensaio clínico de fase I/IIa 24 doentes receberam uma injeção de 2×10^6 CEM alogénicas derivadas do tecido adiposo e uma segunda injeção de 4×10^6 CEM às 12 semanas em caso de não encerramento da fístula. O encerramento completo ocorreu em 38%, 8 de 21 doentes à 12ª semana e 56%, 9 de 16 à 24ª semana.[78]

Posteriormente, foi realizado um ensaio de fase III,[79] na qual participaram 212 doentes de Crohn com fistulas perianais complexas, refratárias à terapia, com doença luminal ligeira ou não ativa. Este é um estudo randomizado e duplamente cego, que apesar de não ser cego ao nível do cirurgião que realizou a injeção das CEM, é cego ao nível dos médicos que realizaram o follow up dos doentes. Todos os doentes foram submetidos a corretagem da fístula e colocação de seton, sendo posteriormente divididos em dois grupos. O grupo Cx106 foi administrado com as CEM injetadas ao longo do trajeto fistuloso, posteriormente da remoção dos setons existentes e encerramento do orifício interno da fístula. O grupo placebo foi submetido a um procedimento igual com injeção de volume semelhante de soro ao invés de Cx106. Os doentes foram avaliados às semanas 6, 12, 18 e 24. Dos 107 doentes designados para Cx601 e dos 105 designados para placebo (avaliados por intention to treat) apenas 103 e 101, respetivamente, foram submetidos ao procedimento (modified intention to treat) e apenas 88 e 83 completaram o follow up das 24 semanas (per protocol). O endpoint primário era encerramento de todos os orifícios externos combinado com ausência de massas superiores a 2cm em RM. Foi obtida a remissão combinada, por ITT, em 50% dos doentes Cx601 e em 34% do grupo controlo ($p=0.024$). A análise secundária mostrou o tempo de resposta e remissão foi mais rápido no grupo Cx601 apesar da diferença da remissão clínica não ser estatisticamente significativa, possivelmente pelo efeito placebo e concomitante terapia médica. Os efeitos adversos reportados (mais frequentemente abscesso e proctalgia) não foram significativamente diferentes entre os dois grupos. Foram testados anticorpos anti-HLA,

sendo que positivaram em 34% dos doentes Cx601 que inicialmente eram negativos. No entanto, não foram registadas reações imunes ou reações adversas relacionadas.

A eficácia a longo prazo foi avaliada posteriormente, às 52 semanas, com uma proporção significativamente maior de doentes tratados com Cx601 a atingir a remissão combinada (56.3%) comparativamente ao grupo controlo (38.6%) ($p=0.01$, por mITT). O perfil de segurança às 52 semanas confirmou a tolerabilidade deste procedimento. [80]

O que falta avaliar?

O tratamento com células estaminais parece ser encorajador, não só pela eficácia mas também pelo seu perfil de segurança. A eficácia parece ser comparável às terapêuticas existentes, com a vantagem de ser uma terapêutica local que não infere lesões ao nível do esfíncter interno. Consequentemente, mantêm a continência esfinteriana sem os efeitos adversos associados aos biológicos ou à imunossupressão.

No entanto, falta definir melhor alguns aspetos da investigação nesta área, nomeadamente a uniformização dos outcomes primários (cicatrização da fístula, definida clínica e imagiologicamente) para poder haver uma melhor comparação entre estudos. Seria importante comparar a injeção de CEM a outras técnicas cirúrgicas e médicas e avaliar se há vantagem na combinação das CEM com imunossupressores ou biológicos.

Ao nível das técnicas de administração, falta determinar a dosagem ótima de CEM, se a injeção repetida é benéfica, e sendo, qual a melhor janela temporal para o fazer. Definir ainda qual a aplicação com melhor rendimento, se injeção ou aplicação num meio de suporte.

É, também, importante determinar a eficácia das CEM em doentes com proctite ativa e a aplicabilidade das CEM noutra fístulas, como as rectovaginais e enterocutâneas.

Uma nota sobre a segurança das CEM: apesar de à partida parecerem seguras, temos pouca informação sobre a sua segurança a longo prazo. Uma revisão sistemática avaliou a segurança da administração sistémica de CEM, não tendo detetado associação entre o tratamento e toxicidade aguda, complicações sistémicas, morte, infeções ou neoplasia. A transformação neoplásica apresentava-se como uma das principais preocupações, tendo em conta que ensaios pré-clínicos demonstraram esta possibilidade in vivo.[81]

Take-home messages

- A doença de Crohn frequentemente complica-se com doença perianal.
- A doença perianal tem grande implicação na qualidade de vida.
- É de difícil controlo e com recorrência frequente apesar de várias técnicas cirúrgicas e médicas existentes.
- Há interesse em novas técnicas com melhor eficácia a longo prazo.
- As células estaminais mesenquimais têm características imunomoduladoras e têm vindo a ser aplicadas em várias doenças auto-imunes.
- Um ensaio clínico de fase III demonstrou eficácia a longo prazo na injeção de células estaminais mesenquimais alogénicas, com bom perfil de segurança.
- As células estaminais mesenquimais são uma ferramenta promissora no tratamento das fístulas perianais associadas à doença de Crohn, faltando aferir a segurança a longo prazo e a melhor administração.

Bibliografia

- [1] N. A. Molodecky *et al.*, “Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review,” *Gastroenterology*, vol. 142, no. 1, pp. 46-54.e42, 2012.
- [2] S. C. Ng *et al.*, “Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies,” *Lancet*, vol. 390, no. 10114, pp. 2769–2778, 2017.
- [3] E. V. Loftus, “Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences,” *Gastroenterology*, vol. 126, no. 6, pp. 1504–1517, 2004.
- [4] M. Gajendran, P. Loganathan, A. P. Catinella, and J. G. Hashash, “A comprehensive review and update on Crohn’s disease,” *Disease-a-Month*, vol. 64, no. 2, pp. 20–57, 2018.
- [5] D. A. Schwartz *et al.*, “The natural history of fistulizing Crohn’s disease in Olmsted County, Minnesota,” *Gastroenterology*, vol. 122, no. 4, pp. 875–880, 2002.
- [6] A. L. Lightner and W. A. Faubion, “Mesenchymal stem cell injections for the treatment of perianal crohn’s disease: What we have accomplished and what we still need to do,” *J. Crohn’s Colitis*, vol. 11, no. 10, pp. 1267–1276, 2017.
- [7] J. Panes *et al.*, “Burden and outcomes for complex perianal fistulas in Crohn’s disease: Systematic review,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 24, no. 42, pp. 4821–4834, 2018.
- [8] G. C. Braithwaite, M. J. Lee, D. Hind, and S. R. Brown, “Prognostic factors affecting outcomes in fistulating perianal Crohn’s disease: a systematic review,” *Tech. Coloproctol.*, vol. 21, no. 7, pp. 501–519, 2017.
- [9] F. Makowiec, E. C. Jehle, and M. Starlinger, “Clinical course of perianal fistulas in Crohn’s disease,” *Gut*, vol. 37, no. 5, pp. 696–701, 1995.
- [10] M. A. Kamm and S. C. Ng, “Perianal Fistulizing Crohn’s Disease: A Call to Action,” *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 6, no. 1, pp. 7–10, 2008.
- [11] E. Ho *et al.*, “Perianal sepsis: surgical perspective and practical MRI reporting for radiologists,” *Abdom. Radiol.*, vol. 44, no. 5, pp. 1744–1755, 2019.
- [12] J. Panés and J. Rimola, “Perianal fistulizing Crohn’s disease: Pathogenesis, diagnosis and therapy,” *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 14, no. 11, pp.

- 652–664, 2017.
- [13] S. J. Bell, A. B. Williams, P. Wiesel, K. Wilkinson, R. C. G. Cohen, and M. A. Kamm, “The clinical course of fistulating Crohn’s disease,” *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 17, no. 9, pp. 1145–1151, 2003.
 - [14] D. A. Schwartz *et al.*, “A comparison of endoscopic ultrasound, magnetic resonance imaging, and exam under anesthesia for evaluation of Crohn’s perianal fistulas,” *Gastroenterology*, vol. 121, no. 5, pp. 1064–1072, 2001.
 - [15] V. Bolshinsky and J. Church, “Management of Complex Anorectal and Perianal Crohn’s Disease,” *Clin. Colon Rectal Surg.*, vol. 32, no. 4, pp. 255–260, 2019.
 - [16] K. M. Tarrant, M. L. Barclay, C. M. A. Frampton, and R. B. Gearry, “Perianal disease predicts changes in Crohn’s disease phenotype - Results of a population-based study of inflammatory bowel disease phenotype,” *Am. J. Gastroenterol.*, vol. 103, no. 12, pp. 3082–3093, 2008.
 - [17] T. W. Eglinton and R. B. Gearry, “Clinical factors predicting disease course in Crohn’s disease,” *Expert Rev. Clin. Immunol.*, vol. 6, no. 1, pp. 41–45, 2010.
 - [18] S. Renna, A. Orlando, and M. Cottone, “Randomized Controlled Trials in Perianal Crohn’s Disease,” *Rev. Recent Clin. Trials*, vol. 7, no. 4, pp. 297–302, Nov. 2012.
 - [19] P. Dewint *et al.*, “Adalimumab combined with ciprofloxacin is superior to adalimumab monotherapy in perianal fistula closure in Crohn’s disease: A randomised, double-blind, placebo controlled trial (ADAFI),” *Gut*, vol. 63, no. 2, pp. 292–299, 2014.
 - [20] K. J. Khan *et al.*, “Antibiotic therapy in inflammatory bowel disease: A systematic review and meta-analysis,” *Am. J. Gastroenterol.*, vol. 106, no. 4, pp. 661–673, 2011.
 - [21] D. C. Pearson, G. R. May, G. H. Fick, and L. R. Sutherland, “Azathioprine and 6-mercaptopurine in Crohn disease: A meta-analysis,” *Ann. Intern. Med.*, vol. 123, no. 2, pp. 132–142, 1995.
 - [22] C. Dejaco, M. Harrer, T. Waldhoer, W. Miehsler, H. Vogelsang, and W. Reinisch, “Antibiotics and azathioprine for the treatment of perianal fistulas in Crohn’s disease,” *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 18, no. 11–12, pp. 1113–1120, 2003.
 - [23] W. J. Sandborn *et al.*, “Tacrolimus for the treatment of fistulas in patients with

- Crohn's disease: A randomized, placebo-controlled trial," *Gastroenterology*, vol. 125, no. 2, pp. 380–388, 2003.
- [24] S. B. Hanauer and M. B. Smith, "Rapid closure of Crohn's disease fistulas with continuous intravenous cyclosporin A," *Am. J. Gastroenterol.*, vol. 88, no. 5, pp. 646–9, May 1993.
 - [25] D. H. Present and S. Lichtiger, "Efficacy of cyclosporine in treatment of fistula of crohn's disease," *Dig. Dis. Sci.*, vol. 39, no. 2, pp. 374–380, Feb. 1994.
 - [26] B. Bressler and B. E. Sands, "Review article: Medical therapy for fistulizing Crohn's disease," *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 24, no. 9, pp. 1283–1293, 2006.
 - [27] M. Sparberg and J. B. Kirsner, "Long-term corticosteroid therapy for regional enteritis: An analysis of 58 courses in 54 patients," *Am. J. Dig. Dis.*, vol. 11, no. 11, pp. 865–880, 1966.
 - [28] G. R. Lichtenstein, E. V. Loftus, K. L. Isaacs, M. D. Regueiro, L. B. Gerson, and B. E. Sands, "ACG Clinical Guideline: Management of Crohn's Disease in Adults," *Am. J. Gastroenterol.*, vol. 113, no. 4, pp. 481–517, 2018.
 - [29] van D. S. Present DH, Rutgeerts P, Targan S, Hanauer SB, Mayer L, van Hogezaand RA, Podolsky DK, Sands BE, Braakman T, DeWoody KL, Schaible TF, "Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease," *N. Engl. J. Med.*, vol. 340, no. 18, pp. 1398–1405, 1999.
 - [30] B. E. Sands *et al.*, "Infliximab Maintenance Therapy for Fistulizing Crohn's Disease," *N. Engl. J. Med.*, vol. 350, no. 9, pp. 876–885, 2004.
 - [31] G. R. Lichtenstein, S. Yan, M. Bala, M. Blank, and B. E. Sands, "Infliximab maintenance treatment reduces hospitalizations, surgeries, and procedures in fistulizing Crohn's disease," *Gastroenterology*, vol. 128, no. 4, pp. 862–869, 2005.
 - [32] E. Domènech *et al.*, "Clinical evolution of luminal and perianal Crohn's disease after inducing remission with infliximab: How long should patients be treated?," *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 22, no. 11–12, pp. 1107–1113, 2005.
 - [33] J. F. Colombel *et al.*, "Adalimumab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease," *Gut*, vol. 58, no. 7, pp. 940–948, 2009.
 - [34] C. Castaño-Milla *et al.*, "Effectiveness of adalimumab in perianal fistulas in Crohn's disease patients naive to Anti-TNF therapy," *J. Clin. Gastroenterol.*, vol.

- 49, no. 1, pp. 34–40, 2015.
- [35] P. J. Van Koperen, F. Safiruddin, W. A. Bemelman, and J. F. M. Slors, “Outcome of surgical treatment for fistula in ano in Crohn’s disease,” *Br. J. Surg.*, vol. 96, no. 6, pp. 675–679, 2009.
 - [36] M. Regueiro and H. Mardini, “Treatment of perianal fistulizing Crohn’s disease with infliximab alone or as an adjunct to exam under anesthesia with seton placement,” *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 9, no. 2, pp. 98–103, 2003.
 - [37] Z. Balciscueta, N. Uribe, I. Balciscueta, J. C. Andreu-Ballester, and E. García-Granero, “Rectal advancement flap for the treatment of complex cryptoglandular anal fistulas: a systematic review and meta-analysis,” *Int. J. Colorectal Dis.*, vol. 32, no. 5, pp. 599–609, 2017.
 - [38] A. Soltani and A. M. Kaiser, “Endorectal advancement flap for cryptoglandular or Crohn’s fistula-in-ano,” *Dis. Colon Rectum*, vol. 53, no. 4, pp. 486–495, 2010.
 - [39] P. G. Kotze *et al.*, “Modern management of perianal fistulas in Crohn’s disease: Future directions,” *Gut*, vol. 67, no. 6, pp. 1181–1194, 2018.
 - [40] D. S. Gingold, Z. A. Murrell, and P. R. Fleshner, “A prospective evaluation of the ligation of the intersphincteric tract procedure for complex anal fistula in patients with crohn’s disease,” *Ann. Surg.*, vol. 260, no. 6, pp. 1057–1061, 2014.
 - [41] M. E. Stellingwerf, E. M. van Praag, P. J. Tozer, W. A. Bemelman, and C. J. Buskens, “Systematic review and meta-analysis of endorectal advancement flap and ligation of the intersphincteric fistula tract for cryptoglandular and Crohn’s high perianal fistulas,” *BJS open*, vol. 3, no. 3, pp. 231–241, 2019.
 - [42] A. Senéjoux *et al.*, “Fistula Plug in Fistulising Ano-Perineal Crohn’s Disease: a Randomised Controlled Trial,” *J. Crohn’s Colitis*, vol. 10, no. 2, pp. 141–148, Feb. 2016.
 - [43] J. Grimaud *et al.*, “Fibrin Glue Is Effective Healing Perianal Fistulas in Patients with Crohn’s Disease,” *Gastroenterology*, vol. 138, no. 7, pp. 2275–2281.e1, Jun. 2010.
 - [44] T. Yamamoto, R. N. Allan, and M. R. B. Keighley, “Effect of fecal diversion alone on perianal Crohn’s disease,” *World J. Surg.*, vol. 24, no. 10, pp. 1258–1263, 2000.
 - [45] S. Singh *et al.*, “Systematic review with meta-analysis: Faecal diversion for management of perianal Crohn’s disease,” *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 42,

- no. 7, pp. 783–792, 2015.
- [46] N. G. Singer and A. I. Caplan, “Mesenchymal Stem Cells: Mechanisms of Inflammation,” *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, vol. 6, no. 1, pp. 457–478, 2011.
 - [47] M. Wang, Q. Yuan, and L. Xie, “Mesenchymal stem cell-based immunomodulation: Properties and clinical application,” *Stem Cells Int.*, vol. 2018, 2018.
 - [48] O. DelaRosa, W. Dalemans, and E. Lombardo, “Mesenchymal stem cells as therapeutic agents of inflammatory and autoimmune diseases,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 23, no. 6, pp. 978–983, 2012.
 - [49] D. Noël *et al.*, “Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials,” *Exp. Cell Res.*, vol. 314, no. 7, pp. 1575–1584, 2008.
 - [50] N. Li and J. Hua, “Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 74, no. 13, pp. 2345–2360, 2017.
 - [51] A. Bartholomew *et al.*, “Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo,” *Exp. Hematol.*, vol. 30, no. 1, pp. 42–48, 2002.
 - [52] M. Giuliani *et al.*, “TLR Ligands Stimulation Protects MSC from NK Killing,” *Stem Cells*, vol. 32, no. 1, pp. 290–300, Jan. 2014.
 - [53] R. S. Waterman, S. L. Tomchuck, S. L. Henkle, and A. M. Betancourt, “A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: Polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype,” *PLoS One*, vol. 5, no. 4, 2010.
 - [54] G. Ren *et al.*, “Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs via Concerted Action of Chemokines and Nitric Oxide,” *Cell Stem Cell*, vol. 2, no. 2, pp. 141–150, 2008.
 - [55] W. Jiang and J. Xu, “Immune modulation by mesenchymal stem cells,” *Cell Prolif.*, vol. 53, no. 1, pp. 1–16, 2020.
 - [56] M. E. Bernardo and W. E. Fibbe, “Mesenchymal stromal cells: Sensors and switchers of inflammation,” *Cell Stem Cell*, vol. 13, no. 4, pp. 392–402, 2013.
 - [57] R. Meisel, A. Zibert, M. Laryea, U. Göbel, W. Däubener, and D. Dilloo, “Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation,” *Blood*, vol. 103, no. 12, pp.

- 4619–4621, Jun. 2004.
- [58] M. Böttcher *et al.*, “Mesenchymal Stromal Cells Disrupt mTOR-Signaling and Aerobic Glycolysis During T-Cell Activation,” *Stem Cells*, vol. 34, no. 2, pp. 516–521, Feb. 2016.
 - [59] M. Brenk *et al.*, “Tryptophan Deprivation Induces Inhibitory Receptors ILT3 and ILT4 on Dendritic Cells Favoring the Induction of Human CD4 + CD25 + Foxp3 + T Regulatory Cells,” *J. Immunol.*, vol. 183, no. 1, pp. 145–154, Jul. 2009.
 - [60] J. H. YlÖstalo, T. J. Bartosh, K. Coble, and D. J. Prockop, “Human Mesenchymal Stem/Stromal Cells Cultured as Spheroids are Self-activated to Produce Prostaglandin E2 that Directs Stimulated Macrophages into an Anti-inflammatory Phenotype,” *Stem Cells*, vol. 30, no. 10, pp. 2283–2296, Oct. 2012.
 - [61] M. Betz and B. S. Fox, “Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines,” *J. Immunol.*, vol. 146, no. 1, pp. 108–113, Jan. 1991.
 - [62] M. Saraiva and A. O’Garra, “The regulation of IL-10 production by immune cells,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 10, no. 3, pp. 170–181, Mar. 2010.
 - [63] C. Xu *et al.*, “TGF- β Promotes Immune Responses in the Presence of Mesenchymal Stem Cells,” *J. Immunol.*, vol. 192, no. 1, pp. 103–109, Jan. 2014.
 - [64] K. English, F. P. Barry, and B. P. Mahon, “Murine mesenchymal stem cells suppress dendritic cell migration, maturation and antigen presentation,” *Immunol. Lett.*, vol. 115, no. 1, pp. 50–58, Jan. 2008.
 - [65] Y.-P. Li *et al.*, “Human Mesenchymal Stem Cells License Adult CD34 + Hemopoietic Progenitor Cells to Differentiate into Regulatory Dendritic Cells through Activation of the Notch Pathway,” *J. Immunol.*, vol. 180, no. 3, pp. 1598–1608, Feb. 2008.
 - [66] H.-W. Chen *et al.*, “Mesenchymal Stem Cells Tune the Development of Monocyte-Derived Dendritic Cells Toward a Myeloid-Derived Suppressive Phenotype through Growth-Regulated Oncogene Chemokines,” *J. Immunol.*, vol. 190, no. 10, pp. 5065–5077, May 2013.
 - [67] M. François, R. Romieu-Mourez, M. Li, and J. Galipeau, “Human MSC Suppression Correlates With Cytokine Induction of Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Bystander M2 Macrophage Differentiation,” *Mol. Ther.*, vol. 20, no. 1, pp. 187–195, Jan. 2012.

- [68] M. H. Abumaree *et al.*, “Human Placental Mesenchymal Stem Cells (pMSCs) Play a Role as Immune Suppressive Cells by Shifting Macrophage Differentiation from Inflammatory M1 to Anti-inflammatory M2 Macrophages,” *Stem Cell Rev. Reports*, vol. 9, no. 5, pp. 620–641, Oct. 2013.
- [69] S. Glennie, I. Soeiro, P. J. Dyson, E. W.-F. Lam, and F. Dazzi, “Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells,” *Blood*, vol. 105, no. 7, pp. 2821–2827, Apr. 2005.
- [70] S. Ghannam, J. Pène, G. Torcy-Moquet, C. Jorgensen, and H. Yssel, “Mesenchymal Stem Cells Inhibit Human Th17 Cell Differentiation and Function and Induce a T Regulatory Cell Phenotype,” *J. Immunol.*, vol. 185, no. 1, pp. 302–312, 2010.
- [71] K. English, J. M. Ryan, L. Tobin, M. J. Murphy, F. P. Barry, and B. P. Mahon, “Cell contact, prostaglandin E 2 and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4 + CD25 High forkhead box P3 + regulatory T cells,” *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 156, no. 1, pp. 149–160, Apr. 2009.
- [72] D. García-Olmo *et al.*, “Autologous stem cell transplantation for treatment of rectovaginal fistula in perinatal Crohn’s disease: A new cell-based therapy,” *Int. J. Colorectal Dis.*, vol. 18, no. 5, pp. 451–454, 2003.
- [73] D. García-Olmo, M. García-Arranz, D. Herreros, I. Pascual, C. Peiro, and J. A. Rodríguez-Montes, “A phase I clinical trial of the treatment of crohn’s fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation,” *Dis. Colon Rectum*, vol. 48, no. 7, pp. 1416–1423, 2005.
- [74] D. Garcia-Olmo *et al.*, “Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: A phase ii clinical trial,” *Dis. Colon Rectum*, vol. 52, no. 1, pp. 79–86, 2009.
- [75] M. Garcia-Arranz *et al.*, “Autologous adipose-derived stem cells for the treatment of complex cryptoglandular perianal fistula: A randomized clinical trial with long-term follow-up,” *Stem Cells Transl. Med.*, no. August, pp. 1–7, 2019.
- [76] A. B. Dietz *et al.*, “Autologous Mesenchymal Stem Cells, Applied in a Bioabsorbable Matrix, for Treatment of Perianal Fistulas in Patients With Crohn’s Disease,” *Gastroenterology*, vol. 153, no. 1, pp. 59-62.e2, 2017.
- [77] R. Ciccocioppo *et al.*, “Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal

- cells in the treatment of fistulising Crohn's disease," *Gut*, vol. 60, no. 6, pp. 788–798, 2011.
- [78] F. De La Portilla, F. Alba, D. García-Olmo, J. M. Herrerías, F. X. González, and A. Galindo, "Expanded allogeneic adipose-derived stem cells (eASCs) for the treatment of complex perianal fistula in Crohn's disease: Results from a multicenter phase I/IIa clinical trial," *Int. J. Colorectal Dis.*, vol. 28, no. 3, pp. 313–323, 2013.
- [79] J. Panés *et al.*, "Expanded allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells (Cx601) for complex perianal fistulas in Crohn's disease: a phase 3 randomised, double-blind controlled trial," *Lancet*, vol. 388, no. 10051, pp. 1281–1290, 2016.
- [80] J. Panés *et al.*, "Long-term Efficacy and Safety of Stem Cell Therapy (Cx601) for Complex Perianal Fistulas in Patients With Crohn's Disease," *Gastroenterology*, vol. 154, no. 5, pp. 1334-1342.e4, 2018.
- [81] M. M. Lalu *et al.*, "Safety of Cell Therapy with Mesenchymal Stromal Cells (SafeCell): A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials," *PLoS One*, vol. 7, no. 10, 2012.